

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 464 723**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/64** (2006.01)  
**A61K 36/06** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)  
**A61P 31/10** (2006.01)  
**C12N 1/14** (2006.01)  
**C12P 21/02** (2006.01)  
**C12R 1/645** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2009 E 09720686 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 2261238**

54 Título: **Compuesto cíclico y sal del mismo**

30 Prioridad:

**14.03.2008 JP 2008065202**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**03.06.2014**

73 Titular/es:

**ASTELLAS PHARMA INC. (100.0%)  
3-11, Nihonbashi-Honcho 2-chome Chuo-ku  
Tokyo 103-8411, JP**

72 Inventor/es:

**NAKAMURA, IKUKO;  
YOSHIKAWA, KOJI;  
OHSUMI, KEISUKE;  
KANASAKI, RYUICHI y  
TAKASE, SHIGEHIRO**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 464 723 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Compuesto cíclico y sal del mismo

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un compuesto cíclico útil como un principio activo de una composición farmacéutica, tal como una composición farmacéutica para el tratamiento de micosis, en particular micosis profundamente arraigadas.

10

**Antecedentes de la técnica**

Cuando un antibiótico se ha administrado durante un periodo de tiempo prolongado, se han eliminado las bacterias patógenas a ser dirigidas, pero los hongos resistentes a antibióticos han aumentado. Se considera que dicha situación provoca micosis profundamente arraigadas (El fenómeno en el que los hongos restantes aumentan notablemente se designa como sustitución microbiana denominada de este modo). Como alternativa, un paciente anciano, un paciente en postoperatorio, o un paciente al que se administra un fármaco antitumoral o un inmunosupresor, está sujeto a la infección por hongos, debido a la biofilaxis suprimida. Se considera que los hongos aumentados en dicho paciente causan micosis profundamente arraigadas.

15

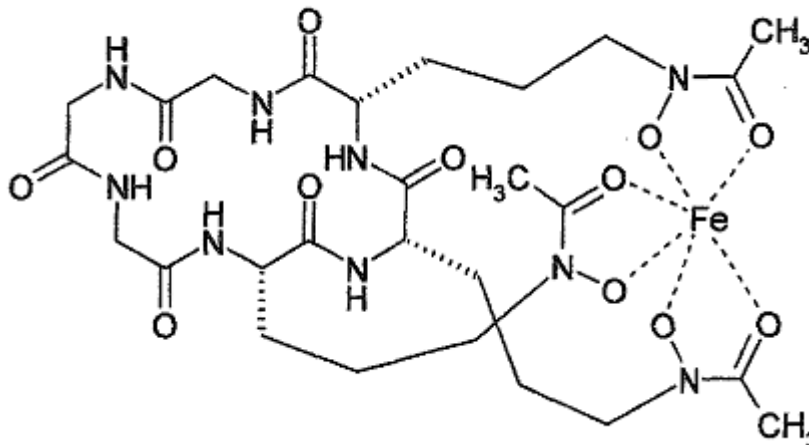
20

Los agentes terapéuticos para las micosis profundamente arraigadas incluyen fármacos antifúngicos, por ejemplo, 1) un fármaco base de ácido nucleico, flucitosina, basado en la inhibición de la síntesis del ADN en los hongos, y 2) un macrólido polieno, anfotericina B, un derivado de imidazol, miconazol, y un derivado de triazol, fluconazol, basado en la inhibición de la síntesis de la membrana celular en los hongos.

25

El ferricromo, un hexapéptido cíclico que contiene tres ornitinas, que tiene la siguiente estructura química, es un compuesto conocido (bibliografía de no patente 1), pero esta referencia no divulga que el ferricromo tiene una actividad antifúngica.

[Quem. 1]



30

[bibliografía de no patente 1] Journal of American Chemical Society, 1980, vol. 102, páginas 4224-4231.

**Divulgación de la invención**

35

**Problemas a resolver por la invención**

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un compuesto útil como un principio activo de una composición farmacéutica, como una composición farmacéutica para el tratamiento de micosis, en particular micosis profundamente arraigadas.

40

**Medios para resolver los problemas**

Los presentes inventores han realizado estudios intensivos sobre compuestos antifúngicos producidos por microorganismos de origen natural y, como resultado, han encontrado que una cepa de hongo *Acremonium persicinum* designada como MF-347833 produce compuestos que tienen una potente actividad antifúngica. Además, los presentes inventores se centraron en el caldo de cultivo de la cepa, y lograron el aislamiento de compuestos cíclicos, que tienen una potente actividad antifúngica, a partir del caldo de cultivo, y de este modo se completó la

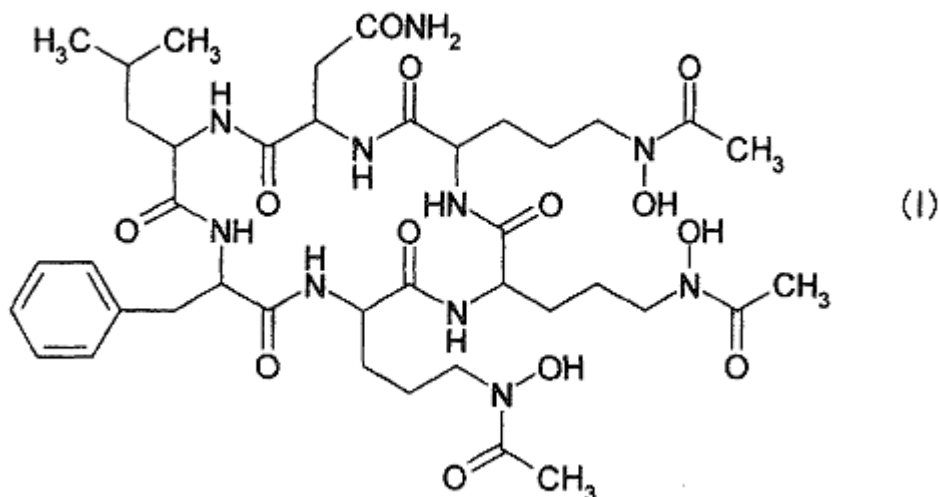
45

presente invención.

La presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo, y una composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula (I) o la sal del mismo y un excipiente.

5

[Quem. 2]



Además, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento de micosis, que comprende el compuesto de fórmula (I) o la sal del mismo, es decir, un agente para tratar micosis, que comprende el compuesto de fórmula (I) o la sal del mismo.

10

Además, la presente invención se refiere a un uso del compuesto de fórmula (I) o la sal del mismo para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de micosis, y un método para tratar de micosis, que comprende administrar, a un sujeto en necesidad del mismo, el compuesto de fórmula (I) o la sal del mismo en una cantidad eficaz para ello.

15

#### Efectos de la invención

El compuesto de fórmula (I) o la sal del mismo se pueden usar como un agente para prevenir y/o tratar micosis, en particular, micosis profundamente arraigadas o similares.

20

#### Breve descripción de las figuras

[Figura 1]

La Figura 1 es un gráfico que muestra el espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto A (Disolvente para la medida: DMSO-d<sub>6</sub>).

25

[Figura 2]

Figura 2 es un gráfico que muestra el espectro de RMN <sup>13</sup>C del compuesto A (Disolvente para la medida: DMSO-d<sub>6</sub>).

30

[Figura 3]

Figura 3 es un gráfico que muestra el espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto B (Disolvente para la medida: DMSO-d<sub>6</sub>).

[Figura 4]

Figura 4 es un gráfico que muestra el espectro de RMN <sup>13</sup>C del compuesto B (Disolvente para la medida: DMSO-d<sub>6</sub>).

35

[Figura 5]

Figura 5 es un gráfico que muestra el espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto D (Disolvente para la medida: DMSO-d<sub>6</sub>).

[Figura 6]

Figura 6 es un gráfico que muestra el espectro de RMN <sup>13</sup>C del compuesto D (Disolvente para la medida: DMSO-d<sub>6</sub>).

40

**Mejor modo de realizar la invención**

La presente invención se explicará en detalle en lo sucesivo en el presente documento.

5 En algunas ocasiones, el compuesto de la presente invención forma una sal con una base. Como dicha sal, se pueden mencionar, por ejemplo, sales con una base inorgánica, tal como sodio, potasio, magnesio, calcio, o similares, o sales con una base orgánica, tal como metilamina, etilamina, etanolamina, lisina, ornitina, o similares. Las sales, tal como se usan en el presente documento incluyen los llamados una sal compleja y un compuesto quelato. Un metal que forma una sal de este tipo puede ser un metal divalente o trivalente, tal como hierro, aluminio, galio, o similar.

10 En lo sucesivo en el presente documento, en algunas ocasiones, una forma libre del compuesto de fórmula (I), una sal de aluminio del compuesto de fórmula (I), una sal de hierro del compuesto de fórmula (I), y una sal de galio del compuesto de fórmula (I) se mencionan como compuesto A, compuesto B, compuesto C, y compuesto D, respectivamente.

15 El compuesto de fórmula (I) existe como varios isómeros geométricos. En algunas ocasiones, el compuesto de fórmula (I) se muestra solamente como un solo isómero en la presente memoria descriptiva, pero la presente invención incluye isómeros distintos del isómero único, y además incluye isómeros aislados y mezclas de los mismos.

20 En algunas ocasiones, el compuesto de fórmula (I) presenta uno o más átomos de carbono asimétrico, y pueden existir varios isómeros ópticos, en base a los átomos de carbono asimétrico. La presente invención incluye isómeros ópticos aislados y mezclas de los mismos.

25 La presente invención incluye un profármaco farmacéuticamente aceptable del compuesto de fórmula (I). El profármaco farmacéuticamente aceptable se refiere a un compuesto que tiene un grupo que se puede convertir en un grupo oxima o similar mediante solvólisis o en condiciones fisiológicas.

30 La presente invención incluye diversos hidratos, solvatos y formas cristalinas del compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo, e incluye además diversos compuestos marcados con un radioisótopo o un no radioisótopo.

35 Las características micológicas de un microorganismo que produce el compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo se describirán a continuación.

**(1) Origen de la cepa de producción**

40 La cepa de hongo MF-347833 del género *Acremonium* se aisló de la hojarasca recogida en el parque nacional Endau Rompin, Johore, Malasia. Esta cepa se ha depositado en el International Patent Organism Depositary Nacional Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Dirección: AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japón) como FERM BP -10916 (fecha de depósito: 10 de octubre de 2007).

**(2) Características morfológicas de la cepa de producción**

45 Las características morfológicas de la cepa se determinaron en base a las observaciones de su forma en un medio de agar de dextrosa y patata. El crecimiento de la cepa en un medio de agar de dextrosa y patata (Difco 2010) fue rápido. Las colonias crecieron hasta un diámetro de 39-41 mm a 25 °C en 2 semanas, y se formaron conidios. Las superficies de las colonias tenían pelusa, y los márgenes de las mismas eran ondulados. Se hicieron surcos radiales en cada colonia desde el centro hacia el margen, pero era difícil identificar estos surcos estriados desde la superficie. Las colonias eran de color blanco (1A1), pero de color blanco amarillento (4A2) en el centro de las mismas. Los surcos formados que irradiaban desde el centro hasta el margen se podían identificar desde el reverso. Las colonias eran generalmente de color marfil (4A3), pero de color marrón mostaza (5E6) en el centro. Las colonias alcanzaron aproximadamente 24 mm de diámetro a 30 °C. Dos semanas más tarde, y no se observó crecimiento alguno a 5 °C y a 37 °C.

60 La cepa creció rápidamente en un medio de agar de harina de maíz (Difco 0386), y las colonias se extendieron hasta un diámetro de 39-40 mm a 25 °C en 2 semanas. La superficie de cada colonia era afieltrada. El margen de las mismas era ondulado, y las colonias no tenían surcos. La superficie era de color blanco (1A1), y el reverso también era de color blanco (1A1). Las colonias alcanzaron un diámetro de 14 mm a 30 °C en 2 semanas, y no tenían surcos. No se observó crecimiento a 5 °C y a 37 °C.

65 Las hifas vegetativas tenían 1,8-2,7 μm de ancho, y sin clamidosporas. Los conidióforos eran hialinos, no ramificados, y se presentaban individualmente desde una sola hifa vegetativa o hifas plectonematógenas. Muchas verrugas en el conidióforo y la base del mismo presentaban septos. La ontogenia de los conidios era fialídica, y la longitud desde la base de cada conidióforo hasta el ápice de las fialides era de 33-40 μm. Los conidios eran hialinos,

elipsoidales, con un tamaño de 3,7 a 4,5 × 2,8 a 3,2 μm (promedio: 4 × 3 μm), agregados en masa en el ápice de las hialinas, pero nunca en cadena. La superficie de los conidios parecía uniforme mediante la observación con un microscopio óptico (x 400), pero se pudo observar un patrón más o menos cóncavo-convexo con un microscopio electrónico (x 9000).

5 Las características morfológicas indican una posibilidad de que la cepa pertenezca al género *Acremonium*. Se realizó una comparación en base a *Cephalosporium*-Artige Schimmelpilze (Hyphomycetes)/Walter Gams (1971), y como resultado, las características morfológicas de la cepa concordaban con las de *Acremonium persicinum* en la sección Gliomastix. Además, como resultado de una búsqueda de homologías con respecto a un ADNr 28S y un ADNr 18S de la cepa, estos ADNr se incluyeron en el clado de *Acremonium persicinum* en la sección Gliomastix. La conclusión a partir de las características morfológicas fue coherente con la de las características genéticas. La cepa se identificó como *Acremonium persicinum*, y se denominó cepa MF-347833 de *Acremonium persicinum*.

15 (3) Características del Cultivo

Las características del cultivo de la cepa se determinaron en medios disponibles en el mercado y en medios preparados de acuerdo con las composiciones que se describen en una referencia. Como un medio de agar de dextrosa y patata, un medio de agar de dextrosa Sabouraud, un medio de agar YpSs de Emerson, un medio de agar de harina de maíz, y un medio de agar de harina de avena, se adquirieron Difco 2010, Difco 0109, Difco 0739, Difco 0386, y Difco 0552, respectivamente. Un medio de agar de extracto de malta, un medio de agar de solución de Czapek, y un medio de agar MY20 se prepararon de acuerdo con las composiciones que se describen en un catálogo de la JCM (Nakase, T. 6ª ed., páginas 617, Colección Japonesa de Microorganismos, Instituto de Investigación Física y Química, Saitama, 1995).

25 La cepa MF-347833 del hongo se inoculó en cada medio de agar, y se observó después del cultivo a 25 °C durante 14 días. Los colores se determinaron de acuerdo con Methuen Handbook of Colour (Kornerup, A. y J. H. Wanscher, 3ª ed., páginas 252, Methuen, Londres, 1987). Las temperaturas de crecimiento se determinaron en el medio de agar de dextrosa y patata (Difco 2010).

30 [Tabla 1]

Características del cultivo de la cepa MF-347833 de <i>Acremonium persicinum</i>	
Medios	Características del cultivo
Agar de extracto de malta	Crecimiento: Rápido. 30-31 mm de diámetro. Superficie: Circular, ondulada en el margen, con pelusa, de color blanco (1A1). Reverso: Amarillo pálido a naranja pálido (5A3).
Agar de dextrosa y patata (Difco 2010)	Crecimiento: Rápido. 39-41 mm de diámetro. Superficie: Circular, ondulada en el margen, con pelusa, de color blanco (1A1) a color blanco amarillento (4A2). Reverso: Con surcos, de color marfil (4A3). Color marrón mostaza en el centro (5E6).
Agar de solución de Czapek	Crecimiento: Rápido. 57-59 mm de diámetro. Superficie: Circular, entera en el margen. Afieltrada, en cierto modo de color gris rojizo en el centro, por lo general de color blanco (1A1). Reverso: Naranja pálido (5A2).
Agar de dextrosa Sabouraud (Difco 0109)	Crecimiento: Rápido. 32-33 mm de diámetro. Superficie: Circular, ondulada en el margen. Forma de estrías. Con pelusa, de color blanco (1A1). Reverso: CON surcos, color blanco amarillento (4A2).
Agar YpSs de Emerson (Difco 0739)	Crecimiento: Rápido. 36-38 mm de diámetro. Superficie: Circular, ondulada en el margen. Afieltrada, por lo general de color blanco (1A1). Reverso: Naranja pálido (5A2).
Agar de harina de maíz (Difco 0386)	Crecimiento: Rápido. 39-40 mm de diámetro. Superficie: Circular, ondulada en el margen. Afieltrada, por lo general de color blanco (1A1). Reverso: Blanco (1A1).
Agar MY20	Crecimiento: Rápido. 34-35 mm de diámetro. Superficie: Circular, entera en el margen. Con pelusa, de color blanco (1A1). Reverso: Amarillo pálido (4A4).

Características del cultivo de la cepa MF-347833 de <i>Acremonium persicinum</i>	
Medios	Características del cultivo
Agar de harina de avena (Difco 0552)	Crecimiento: Rápido. 50-51 mm de diámetro. Superficie: Circular, entera en el margen. Con pelusa, color blanco amarillento (4A2) en el centro, por lo general de color blanco (1A1). Reverso: Amarillo pálido (4A4).

En algunas ocasiones, la cepa muestra variaciones de origen artificial o natural. La cepa MF-347833 del hongo *Acremonium persicinum* usada en la presente invención incluye no solo la cepa aislada originalmente, sino también variaciones artificiales causados por rayos ultravioletas, rayos de radiación, agentes químicos, o similares, y variaciones de origen natural.

(Proceso de Producción)

El compuesto de la presente invención se puede obtener mediante cultivo de un microorganismo que pertenece al género *Acremonium* y tiene una actividad para producir el compuesto de la presente invención. El microorganismo se puede cultivar de acuerdo con métodos generales de cultivo de microorganismos.

El medio a usar no se limita en particular, siempre y cuando contenga fuentes de nutrientes que se puedan usar por la cepa MF-347833 del hongo *Acremonium persicinum*. Se puede usar un medio sintético, un medio semisintético o un medio natural. Con respecto a la composición del medio, como fuente de carbono se puede usar L-arabinosa, D-xilosa, D-glucosa, D-fructosa, sacarosa, inositol, L-ramnosa, rafinosa, D-manitol, manosa, melibiosa, lactosa, D-galactosa, maltosa, trehalosa, salicina, xantina, quitina, almidón, glucosa, dextrina, glicerol, aceite vegetal, o similares. Como fuente de nitrógeno se puede usar extracto de carne, peptona, harina de gluten, harina de semilla de algodón, polvo de soja, polvo de cacahuete, harina de pescado, agua de macerado de maíz, levadura seca, extracto de levadura, cloruro de amonio, sulfato de amonio, nitrato de amonio, ácido úrico, u otras fuentes de nitrógeno orgánicas o inorgánicas. Si se desea, se puede añadir sulfato, nitrato, carbonato, fosfato, o similares de sodio, potasio, magnesio, calcio, cinc, hierro, cobalto, o similares en forma de sales de metal. Además, si se desea, se puede añadir un compuesto para promover la generación o un agente antiespumante, tal como metionina, cisteína, cistina, tiosulfato, oleato de metilo, aceite de manteca de cerdo, aceite de silicio, agentes tensioactivos, o similares.

Con respecto a las condiciones de cultivo, generalmente se prefiere cultivar la cepa en condiciones aerobias, a la temperatura de 8,9 a 31,2 °C, preferentemente de aproximadamente 26,0 a 27,6 °C. El periodo de cultivo se puede seleccionar apropiadamente de acuerdo con la composición del medio o las condiciones de temperatura, pero es generalmente de aproximadamente 1 a 30 días, preferiblemente de aproximadamente 2 a 7 días.

El compuesto de la presente invención se puede purificar y aislar de un cultivo de acuerdo con métodos convencionales de purificación y aislamiento de una sustancia fisiológicamente activa a partir de un cultivo de un microorganismo común. Más particularmente, un cultivo se extrae con un disolvente orgánico apropiado, y una sustancia deseada se purifica y se aísla a partir del extracto resultante. Es decir, la separación y la purificación se realizan usando una actividad antifúngica tal como un índice, por métodos que usan la diferencia de solubilidad para un disolvente apropiado, o similares, y se usan en la preparación de una sustancia fisiológicamente activa común. Estos métodos se pueden usar apropiadamente, por sí solos, en una combinación deseada de los mismos, o varias veces. Como otros métodos para purificación, un cultivo per se, o un sobrenadante preparado mediante la eliminación de los hongos de un cultivo por centrifugación o filtración, se puede someter a métodos que utilizan la diferencia de solubilidad para un disolvente apropiado, la diferencia en la velocidad de precipitación de una solución, la diferencia en la afinidad de adsorción a diversos adsorbentes, la diferencia en la distribución entre dos fases líquidas, o similares. Por ejemplo, un líquido de cultivo se puede poner en contacto con un vehículo apropiado, y un compuesto adsorbido se puede eluir con un disolvente apropiado del vehículo para purificar el compuesto. Estos métodos se pueden usar apropiadamente, por sí solos, en una combinación deseada de los mismos, o varias veces.

La sal del compuesto de fórmula (I), que se incluye en el compuesto de la presente invención, se puede preparar haciendo reaccionar el compuesto de fórmula (I) con una sal inorgánica, tales como  $\text{Al}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ga}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  o similares en las condiciones de una temperatura ambiente a una temperatura de calentamiento en un disolvente que no afecte a la reacción. Los ejemplos del disolvente no están limitados en particular, pero incluyen una solución acuosa que contiene alcoholes tales como metanol. La temperatura de reacción es preferentemente de 10 °C a 50 °C.

El compuesto cíclico (I) o la sal del mismo de acuerdo con la presente invención se pueden obtener por cultivo de un microorganismo capaz de producir el compuesto o la sal en un medio nutriente, y separar el compuesto deseado a partir del cultivo resultante de acuerdo con un método convencional. El microorganismo usado en el método de producción no está limitado en particular, siempre y cuando pertenezca al género *Acremonium* y pueda producir el compuesto.

La composición farmacéutica que comprende uno, o dos o más de los compuestos de fórmula (I) o sales de los mismos como el principio activo se puede preparar de acuerdo con métodos de uso común, usando excipientes usados generalmente en el campo, tales como excipientes farmacéuticos, vehículos farmacéuticos, o similares.

5 Los ejemplos de administración incluyen administración oral por comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, polvos, líquidos, y similares, y administración parenteral por inyecciones (por ejemplo, intraarticular, intravenosa, intramuscular, o similar), supositorios, soluciones oftálmicas, pomadas oftálmicas, líquidos transdérmicos, pomadas, accesorios transdérmicos, líquidos transmucosales, parches transmucosales, agentes de inhalación, y similares.

10 Para una formulación sólida para la administración oral, se pueden usar comprimidos, polvos, gránulos, o similares. Dicha formulación sólida se puede preparar mediante la mezcla de uno, o dos o más de los principios activos con al menos un excipiente inerte, tal como lactosa, manitol, glucosa, hidroxipropil celulosa, celulosa microcristalina, almidón, polivinilpirrolidona, metasilicato aluminato de magnesio, y/o similares. La composición puede contener aditivos inertes, por ejemplo, lubricantes tales como estearato de magnesio, disgregantes tales como carboximetil almidón de sodio o similares, estabilizantes, o agentes de disolución auxiliares, de acuerdo con métodos convencionales. Los comprimidos o píldoras se pueden revestir con un revestimiento de azúcar o una película de una sustancia gástrica o entérica, si se desea.

20 La composición líquida para administración oral incluye emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes, elixires, o similares farmacéuticamente aceptables, y contiene disolventes inertes usados habitualmente, tales como agua destilada o etanol. Además de los disolventes inertes, la composición líquida puede contener agentes auxiliares (tales como solubilizantes, agentes humectantes, o agentes de suspensión), edulcorantes, sabores, agentes aromáticos, o conservantes.

25 Las inyecciones para administración parenteral incluyen, líquidos, suspensiones, y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. El disolvente acuoso incluye, por ejemplo, agua destilada para inyecciones y solución salina fisiológica. El disolvente no acuoso incluye, por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, alcoholes tales como etanol, polisorbato 80 (nombre en Farmacopea), y similares. Dichas composiciones pueden contener además agentes isotónicos, conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, dispersantes, estabilizantes, o agentes de disolución auxiliar. Estas composiciones se pueden esterilizar, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención de bacterias, mezcla de un germicida o radiación. Como alternativa, se pueden usar convirtiéndolos primero en composiciones sólidas estériles y disolviéndolos o suspendiéndolos en agua estéril u otro disolvente estéril para uso en inyección antes de su uso.

35 Las preparaciones externas incluyen pomadas, emplastos, cremas, gelatinas, cataplasmas, aerosoles, lociones, soluciones oftálmicas, pomadas oftálmicas, y similares. Dichas preparaciones contienen bases para pomada, bases de loción, líquidos acuosos o no acuosos, suspensiones, emulsiones, o similares usados habitualmente. Los ejemplos de las bases de pomada o loción son polietilenglicol, propilenglicol, vaselina blanca, cera de abejas blanca, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno, monoestearato de glicerilo, alcohol estearílico, alcohol cetílico, lauromacrogol, sesquioleato de sorbitán, y similares.

45 Agentes transmucosales tales como agentes de inhalación y agentes transnasales se pueden usar en las formas sólida, líquida, o semisólida, y se pueden preparar por métodos convencionales. Por ejemplo, se pueden añadir, si se desea, excipientes conocidos, ajustadores del pH, conservantes, agentes tensioactivos, lubricantes, estabilizantes, espesantes, o similares. Para la administración, se pueden usar dispositivos adecuados para inhalación o insuflación. Por ejemplo, usando dispositivos conocidos (tales como un dispositivo de inhalación para la administración de dosis medida) o pulverizadores, el compuesto se puede administrar solo, o se puede administrar en una forma de polvo de una mezcla formulada o en forma de una solución o suspensión con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un dispositivo de inhalación para polvo seco o similar puede ser un dispositivo para la administración individual o varias administraciones, y se puede usar un polvo seco o una cápsula que contiene polvo. Como alternativa, el compuesto se puede administrar en forma de una pulverización de aerosol a presión, o similar, usando un agente apropiado para la eyección, por ejemplo, un gas apropiado tal como clorofluoroalcano, hidrofluoroalcano, dióxido de carbono, o similar.

55 En el caso de la administración oral, la dosis habitual es de aproximadamente 0,01 a 100 mg/kg, preferentemente de 0,1 a 10 mg/kg al día, que se administra en una porción o de dos a cuatro porciones. En el caso de administración intravenosa, la dosis habitual es de aproximadamente 0,01 a 100 mg/kg al día, que se administra una vez o varias veces al día. La dosis se determina aproximadamente teniendo en cuenta cada caso, por ejemplo, síntomas, edad, sexo, o similares de cada paciente a administrar.

60 El compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo se pueden usar junto con diversos agentes para tratar o prevenir enfermedades para las que se considera que el compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo son eficaces. La administración se puede realizar simultáneamente, o sucesivamente sin intervalo o con un intervalo apropiado. La administración simultánea se puede realizar en forma de una sola formulación, o en forma de formulaciones discretas.

65

## Ejemplos

El proceso para preparar el compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos, y el compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo se puede preparar mediante la combinación de estos procesos, o un método convencional evidente para el experto en la materia.

Las abreviaturas que se muestran en la Tabla 2 se usarán en los siguientes Ejemplos, Ejemplos Preparativos, y Tablas.

10

[Tabla 2]

Abreviaturas	Nombres completos
$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de aluminio y potasio dodecahidratado
$\text{CHCl}_3$	Cloroformo
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de hierro (III) hexahidratado.
$\text{Ga}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de galio (III) sulfato hidratado
KCl	Cloruro potásico
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Dihidrogenofosfato potásico
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de magnesio heptahidratado
$\text{NaNO}_3$	Nitrato sódico
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sulfato de amonio
TFA	Ácido trifluoroacético
HR ESI MS	MS de ionización por electropulverización de alta resolución

### Ejemplo 1

(Producción del cultivo del compuesto A)

15

Un medio de siembra 1 (véase la Tabla 3, 30 ml) se vertió en un matraz Erlenmeyer (tamaño: 100 ml) y se esterilizó por tratamiento en autoclave (121 °C, 30 minutos). Una carga completa de la cepa MF-347833 del hongo se inoculó asépticamente a partir de un cultivo inclinado en el medio de siembra 1, y se cultivó a 25 °C durante 4 días mientras que se agitaba en un agitador rotatorio (220 rpm). A continuación, un medio de producción 1 (véase la Tabla 4, 100 ml) se vertió en un matraz Erlenmeyer (tamaño: 500 ml) y se esterilizó por tratamiento en autoclave (121 °C, 30 minutos). El cultivo de siembra (2 ml) se inoculó asépticamente en este matraz, y se cultivó a 25 °C durante 7 días mientras que se agitaba en un agitador rotatorio (220 rpm). El cultivo se controló por HPLC (HPLC1 analítica; Con respecto a las condiciones, véase la Tabla 5).

25

[Tabla 3]

Medio de siembra 1	
Componentes del medio	Contenidos (%)
Almidón de maíz	2
Glicerol	1
Sacarosa	1
Medios farma	1
Harina de gluten	1
Tween 80	0,2



[Tabla 4]

Medio de producción 1	
Componentes del medio	Contenidos (%)
Glucosa	0,5
Almidón de maíz (Nacalai Tesque)	1,5
Extracto de levadura (Wako Pure Chemical Industries)	0,5
KC1	0,02
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,02
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1
NaNO <sub>3</sub>	0,2

[Tabla 5]

Condiciones en HPLC1 analítica	
Columna	Mightysil RP-18 GP 150-4,6 (5 µm), Kanto Chemical
Fase móvil	MeCN:agua = 28:72 (v/v) (que contiene NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> al 0,5 %)
Caudal	1 ml/min.
Longitud de onda para detección	210 nm
Tiempo de retención	Aproximadamente 4,2 min.

5

(Aislamiento y purificación del compuesto A)

Al cultivo (2,6 l) obtenido mediante el método de cultivo anterior, se añadió un volumen igual de acetona. Esta mezcla se agitó durante 1 hora, y se filtró para obtener un extracto de cultivo. El extracto del cultivo resultante se mezcló con un volumen de agua dos veces, y se aplicó a una columna SP 850 de Diaion (tamaño: 400 ml; Mitsubishi Chemical). La elución se realizó usando un disolvente mixto [acetona:agua = 30:70 (v/v), 1,9 l].

10

El eluato resultante se mezcló con agua (2,1 l). Todo se aplicó a una columna SP-120-ODS-B de Daisogel (tamaño: 350 ml, 15/30 µm; DAISO), y se eluyó con un disolvente mixto [MeCN:agua = 25:75 (v/v), 340 ml].

15

A este eluato, se añadió agua (350 ml), y se aplicó en un cartucho OASIS HLB (tamaño: 6 g; Waters), y se eluyó con MeOH (150 ml). El eluato obtenido se concentró a presión reducida, y se añadió acetona al concentrado para obtener un precipitado. Este precipitado se secó para obtener un polvo de color amarillo (100 mg).

20

Una porción (15 mg) de este polvo de color amarillo se disolvió en una pequeña cantidad de MeOH, y se purificó por HPLC1 preparativa (Con respecto a las condiciones, véase la Tabla 6). Se recoge un pico en el tiempo de elución de aproximadamente 22 minutos. La fracción recogida se mezcló con un volumen igual de agua, y se aplicó a un cartucho OASIS HLB (tamaño: 500 mg).

25

Se pasó agua (50 ml) a través del cartucho, y la elución se realizó usando MeOH (50 ml). Este eluato se concentró a presión reducida, y se añadió acetona al concentrado para obtener un precipitado. Este precipitado se secó para obtener el compuesto A (13 mg) en forma de un polvo de color blanco.

[Tabla 6]

Condiciones en HPLC1 preparativa	
Columna	columna C18 de 7 µm Symmetry, 19 x 300 mm, Waters
Fase móvil	MeCN:agua = 27:73 (v/v) (que contiene al TFA 0,05 %)
caudal	7 ml/min.

30

(Propiedades fisicoquímicas del compuesto A)

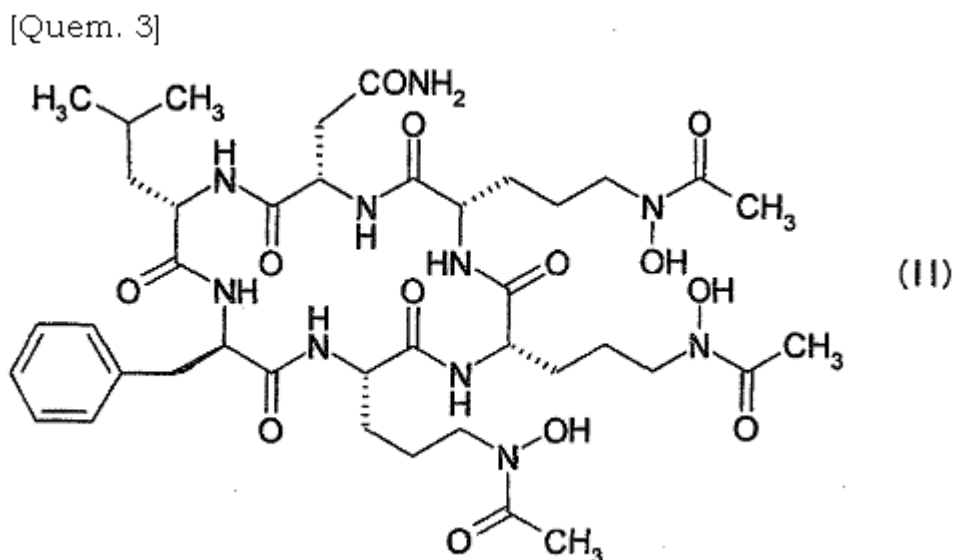
El compuesto A purificada y aislado mediante el proceso anterior mostró las propiedades fisicoquímicas que se muestran en la Tabla 7.

35

[Tabla 7]

Propiedades fisicoquímicas del compuesto A	
Color y forma	Polvo de color blanco
Rotación óptica	$[\alpha]_D^{25} -57^\circ$ (c 0,01, MeOH)
Fórmula molecular	$C_{40}H_{62}N_{10}O_{13}$
HR ESI-MS	Encontrado 891,4592 (M+H) <sup>+</sup> , Calcd 891,4576
IR (KBr) $cm^{-1}$	3300, 2950, 1680, 1650, 1640, 1540, 1460, 1420, 1240, 1210, 1160, 1040, 970
Espectro de RMN $^1H$	Se muestra en la Figura 1
Espectro de RMN $^{13}C$	Se muestra en la Figura 2

5 A partir de las propiedades fisicoquímicas se concluyó que el compuesto A tiene una estructura química de la siguiente fórmula (II). Además, se concluyó que las configuraciones de los aminoácidos componentes eran D-Phe, L-Leu y L-Asn de acuerdo con un método modificado de Marfey. Con respecto a la parte de la ornitina, el compuesto A se comparó con un análogo de origen natural, Ferricromo (bibliografía de no patente 1), y se supuso que era L-ornitina, debido a que un análisis de aminoácidos mostró que tres aminoácidos eran idénticos.



## 10 Ejemplo 2

(Producción de cultivo de los compuestos B y C)

15 Un medio de siembra 2 (véase la Tabla 8, 30 ml) se vertió en un matraz Erlenmeyer (tamaño: 100 ml) y se esterilizó por tratamiento en autoclave (121 °C, 30 minutos). Una carga completa de la cepa MF-347833 del hongo se inoculó asépticamente a partir de un cultivo inclinado en el medio de siembra, y se cultivó a 25 °C durante 4 días mientras que se agitaba en un agitador rotatorio (220 rpm).

20 El mismo medio de siembra (160 ml) se vertió en un matraz Erlenmeyer (tamaño: 500 ml) y se esterilizó por tratamiento en autoclave (121 °C, 30 minutos). El cultivo de siembra (3,2 ml) se inoculó asépticamente en este medio de siembra, y se cultivó a 25 °C durante 3 días mientras que se agitaba en un agitador rotatorio (220 rpm).

25 A continuación, un medio de producción 2 preparado previamente (véase la Tabla 9, 20 l) se vertió en un tarro fermentador (tamaño: 30 l) y se esterilizó (121 °C, 30 minutos). El cultivo de siembra (480 ml) se inoculó asépticamente en el tarro fermentador, y se cultivó a 25 °C durante 7 días con aireación a 20 l/min y agitación a 200 rpm. El cultivo se controló por HPLC (HPLC2 analítica; con respecto a las condiciones, véase la Tabla 11).

30 Cuando se usó un medio de producción 3 en lugar del medio de producción 2, la producción del cultivo anterior se pudo realizar en las mismas condiciones de cultivo.

[Tabla 8]

Medio de siembra 2	
Componentes del medio	Contenidos (%)
Almidón de maíz	2
Glicerol	1
Sacarosa	1
Medios farma	1
Harina de gluten	1
Tween 80	0,2

[Tabla 9]

Medios de producción 2	
Componentes del medio	Contenidos (%)
Glucosa	0,5
Almidón de maíz (Nacalai Tesque)	1,5
Extracto de levadura (WaKo Pure Chemical Industries)	0,5
Adekanol LG-109 (ADEKA)	0,05
Silicona KM-70 (Shin-Etsu Chemical)	0,05
KCl	0,02
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,02
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1
NaNO <sub>3</sub>	0,2

5

[Tabla 10]

Medio de producción 3	
Componentes del medio	Contenidos (%)
Sacarosa	4
Levadura seca (Asahi Food and Healthcare)	1,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5
Carbonato cálcico	0,5

[Tabla 11]

Condiciones en HPLC2 preparativa	
Columna	Mightysil RP-18 GP 150-4,6 (5 µm), Kanto Chemical
Fase móvil	MeCN:H <sub>2</sub> O = 28:72 (v/v) (que contiene NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> al 0,5 %)
Caudal	1 ml/min.
Longitud de onda para detección	210 nm
Tiempo de retención	Compuesto B (aproximadamente 8,7 min.), Compuesto C (aproximadamente 10 min.)

(Aislamiento y purificación de los compuestos B y C)

10

Al cultivo (medio de producción 2: 90 l) obtenido mediante el método de cultivo anterior, se añadió un volumen igual de acetona. Esta mezcla se agitó durante 1 hora, y se filtró para obtener un extracto del cultivo. El líquido del extracto del cultivo se mezcló con un volumen igual de agua, y se aplicó a una columna SP 850 de Diaion (10 l; Mitsubishi Chemical). la elución se realizó usando un disolvente mixto [acetona:agua = 40: 60 (v/v), 40 l].

Al eluato resultante, se añadió un volumen igual de agua. El total se aplicó a una columna SP-120-ODS-B de Daisogel (15/30  $\mu\text{m}$ , tamaño: 2 l; DAISO), y se eluyó con una mezcla de disolventes [MeCN:agua = 25:75 (v/v), 7 l].

5 A este eluato, se añadió un volumen igual de agua. El total se aplicó a una columna SP-120-ODS-B de Daisogel (tamaño: 2 l) de nuevo, y se eluyó con una mezcla de disolventes [MeCN:agua = 27,5:72,5 (que contiene al TFA 0,05 %) (v/v)].

10 A este eluato, se añadió un volumen igual de agua. El total se aplicó a una columna SP-120-ODS-B de Daisogel (tamaño: 180 ml) de nuevo, y se eluyó con MeOH. El eluato obtenido se concentró a presión reducida.

El residuo resultante se disolvió en una pequeña cantidad de MeOH, y se purificó por HPLC2 preparativa (Con respecto a las condiciones, véase la Tabla 12).

15 Se mezcló una fracción en el tiempo de evolución de aproximadamente 24 a 25 minutos con un volumen igual de agua, y se aplicó a un cartucho OASIS HLB (tamaño: 6 g; Waters). Se pasó agua (100 ml) a través del cartucho, y la elución se realizó usando MeOH (100 ml). Este eluato se concentró a presión reducida, se sustituyó con agua, y se liofilizó para obtener el compuesto C (130 mg) en forma de polvo. Este polvo se cristalizó usando disolventes (MeOH, acetato de etilo, y n-hexano) para obtener el compuesto C en forma de cristales de color naranja.

20 El procedimiento anterior se repitió, excepto en que se usó otra fracción en el tiempo de elución de aproximadamente 19 a 21 minutos, para obtener polvo. Este polvo se disolvió en  $\text{CHCl}_3$ , y se purificó con una cromatografía en columna sobre gel de sílice (Spherical 60N, neutro, 40-100  $\mu\text{m}$ , Kanto Chemical;  $\text{CHCl}_3$  : MeOH = 10:1). El eluato resultante se concentró a presión reducida, se sustituyó con agua, y se liofilizó para obtener el compuesto B (150 mg) en forma de polvo de color blanco. Este polvo de color blanco (109 mg) se cristalizó usando disolventes (MeOH, acetato de etilo, y n-hexano) para obtener el compuesto B (90,1 mg) en forma de cristales incoloros.

[Tabla 12]

Condiciones en HPLC2 preparativa	
Columna	columna Mightysil RP-18 GP, 250 x 20 mm de DI., Kanto Chemical
Fase móvil	MeCN:agua = 30:70 (v/v) (que contiene TFA al 0,05 %)
Caudal	10 ml/min.

30 (Propiedades fisicoquímicas del compuesto B)

El compuesto B purificado y aislado mediante el proceso anterior mostró las propiedades fisicoquímicas que se muestran en la Tabla 13, y por lo tanto, nosotros supusimos que era un compuesto en el que la relación del compuesto a aluminio es 1:1.

35

[Tabla 13]

Propiedades fisicoquímicas del compuesto B	
Color y forma	Cristales incoloros
Rotación óptica	$[\alpha]_D^{25} + 210^\circ$ (c 0,01, MeOH)
Fórmula molecular	$\text{C}_{40}\text{H}_{59}\text{AlN}_{10}\text{O}_{13}$
HR ESI-MS	Encontrado 915,4191 (M+H) <sup>+</sup> , Calcd 915,4157
IR (KBr) $\text{cm}^{-1}$	3300, 2930, 1680, 1650, 1620, 1520, 1370, 1240, 1140, 990
Punto de fusión	295 °C
Espectro de RMN $^1\text{H}$	Se muestra en la Figura 3
Espectro de RMN $^{13}\text{C}$	Se muestra en la Figura 4

(Propiedades fisicoquímicas del compuesto C)

40 A partir del análisis estructural por rayos X de cristal único y el hecho de que el compuesto C se purificó y se aisló mediante el proceso anterior mostraron las propiedades fisicoquímicas que se muestran en la Tabla 14, y por lo tanto, nosotros determinamos que era un compuesto en el que la relación del compuesto a hierro es 1:1.

[Tabla 14]

Propiedades fisicoquímicas del compuesto C	
Color y forma	Cristales de color naranja
Rotación óptica	$[\alpha]_D^{25} +256^\circ$ (c 0,01, MeOH)
Fórmula molecular	$C_{40}H_{59}FeN_{10}O_{13}$
HR ESI-MS	Encontrado 944,3693 (M+H) <sup>+</sup> , Calcd 944,3691
Análisis estructural por rayos X de cristal único	a = 13,850 (1) Å, b = 15,135 (1) Å, c = 24,290 (2) Å, V = 5091,6 (6) Å <sup>3</sup>

Ejemplo 3

## 5 (Preparación del compuesto D)

El compuesto A (4 mg) se disolvió en una mezcla de MeOH (0,4 ml) y agua (0,4 ml), y la solución resultante se mezcló con una solución acuosa (1,2 ml) de  $Ga_2(SO_4)_3 \cdot nH_2O$  (10 mg), y se agitó durante 18 horas a 25 °C. Se añadió agua (18 ml) al líquido de reacción, y el total se aplicó a un cartucho OASIS HLB (fabricado por Waters). Se pasó agua (6 ml) a través del cartucho, y el compuesto deseado se eluyó del cartucho con metanol (4 ml). El eluato resultante se concentró a presión reducida para obtener el compuesto D (4 mg) en forma de polvo de color blanco.

10

(Propiedades fisicoquímicas del compuesto D)

15 El compuesto D preparado mediante el proceso anterior mostró las propiedades fisicoquímicas que se muestran en la Tabla 15, y por lo tanto, nosotros supusimos que era un compuesto en el que la relación del compuesto A a galio es 1:1.

[Tabla 15]

Propiedades fisicoquímicas del compuesto D	
Fórmula molecular	$C_{40}H_{59}GaN_{10}O_{13}$
HR ESI-MS	Encontrado 957,3597 (M+H) <sup>+</sup> , Calcd 957,3597
Espectro de RMN <sup>1</sup> H	Se muestra en la Figura 5
Espectro de RMN <sup>13</sup> C	Se muestra en la Figura 6

20

Ejemplo 4

(Ensayo de actividad antifúngica)

25 Las actividades antifúngicas para someter a ensayo los hongos que se muestran en la Tabla 15 se determinaron mediante un método de microdilución de caldo (Hikaru Kume y Toshikazu Yamazaki, Clinical Microbiology, Vol. 21, N° 5, páginas 573-580, 1994). El resultado del ensayo para actividades antifúngicas del compuesto B frente a los hongos de ensayo se muestra en la Tabla 16.

30

[Tabla 16]

Concentraciones eficaces mínimas (MEC) del compuesto B	
Hongos de ensayo	MEC (µg/ml)
Candida krusei FP1979	0,31
Candida glabrata FP1944	0,31
Candida guilliermondii FP2086	0,31
Candida parapsilosis FP1980	0,39
Cryptococcus neoformans FP1739	0,2
Aspergillus fumigatus FP1305	0,31
Aspergillus terreus SR0174	0,31
Aspergillus niger ATCC6275	0,78

Concentraciones eficaces mínimas (MEC) del compuesto B	
Hongos de ensayo	MEC ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC9643	0,2
<i>Trichosporon asahi</i> FP2044	0,2
<i>Fusarium solani</i> FP1930	0,2
<i>Pseudallescheria boydii</i> FP1987	0,2
<i>Rhizopus oryzae</i> FP1988	25
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> FP2103	0,78
<i>Trichophyton rubrum</i> FP596	1,25
<i>Alternaria alternata</i> AHU9258	0,1

Como resultado, se confirmó que el compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo tienen una actividad antifúngica. El compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo se pueden usar en el tratamiento o similares de micosis, en particular micosis profundamente arraigadas o similares, tales como sinusitis micótica.

5 En esta conexión, por ejemplo, el ferricromo (adquirido en Sigma) tenía una MEC de 50  $\mu\text{g/ml}$  o superior en *Aspergillus fumigatus* FP1305.

#### Ejemplo 5

10 (Ensayo de citotoxicidad)

Se consideró la citotoxicidad mediante la adición de un fármaco de ensayo a la línea celular EL-4 de linfoma T de ratón a diversas concentraciones, se incubaron las células en una incubadora con  $\text{CO}_2$  a 37 °C durante 72 horas, se hizo recuento de las células usando un kit de recuento celular (Wako Pure Chemical Industries), y se calcularon los valores de  $\text{TC}_{50}$ .

15 Como resultado, por ejemplo, el compuesto B no mostró un efecto citotóxico a las células EL-4 a una concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$ .

#### 20 **Aplicabilidad industrial**

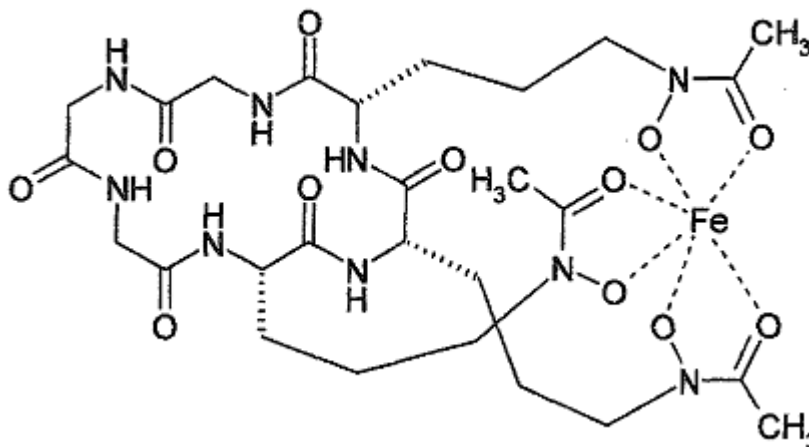
El compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo se pueden usar como un agente para prevenir y/o tratar micosis, en particular, micosis profundamente arraigadas o similares.

25

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo.

[Quem. 1]



5

2. El compuesto o una sal del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, donde la sal del compuesto es una sal de aluminio o una sal de hierro.

10 3. El compuesto o una sal del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, donde la sal del compuesto es una sal de aluminio.

15 4. El compuesto o la sal del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, que se obtienen al cultivar la cepa MF-347833 de *Acremonium persicinum* con N° de Depósito FERM BP-10916, y al someter un caldo de cultivo resultante a extracción y purificación.

20 5. Un proceso para preparar el compuesto o la sal del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende cultivar una cepa que pertenece a un género de hongos *Acremonium*, y aislar el compuesto de fórmula (I) a partir de un caldo de cultivo resultante.

6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 5, donde la cepa que pertenece al género de hongos *Acremonium* es cepa MF-347833 de *Acremonium persicinum* con N° de Depósito FERM BP-10916.

25 7. El compuesto o una sal del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, donde la sal del compuesto es una sal de galio.

8. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto o la sal del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

30 9. Una composición farmacéutica para prevenir o tratar micosis, que comprende el compuesto o la sal del mismo de acuerdo con la reivindicación 1.

10. Uso del compuesto o la sal del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 para la preparación de una composición farmacéutica para prevenir o tratar micosis.

35

11. El compuesto o la sal del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en un método para prevenir o tratar micosis.

Figura 1

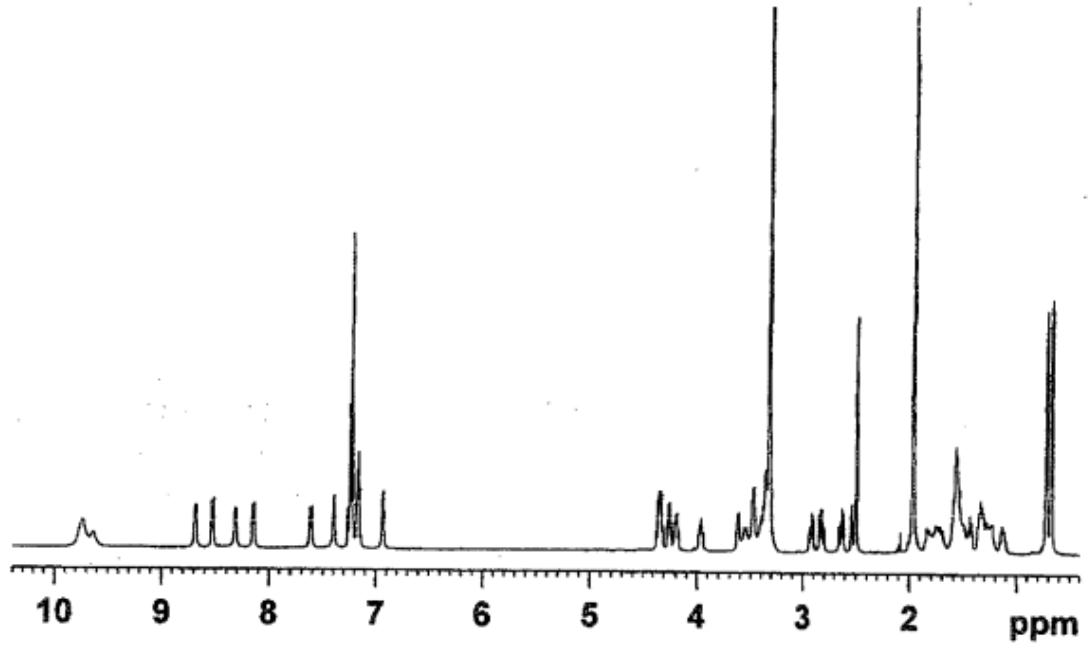


Figura 2

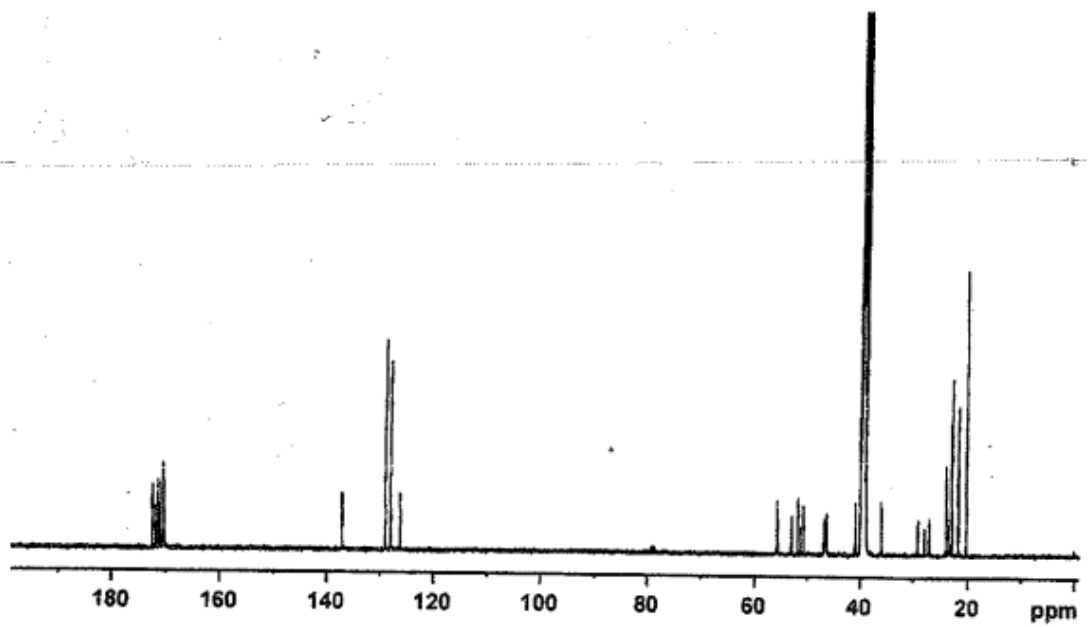




Figura 3

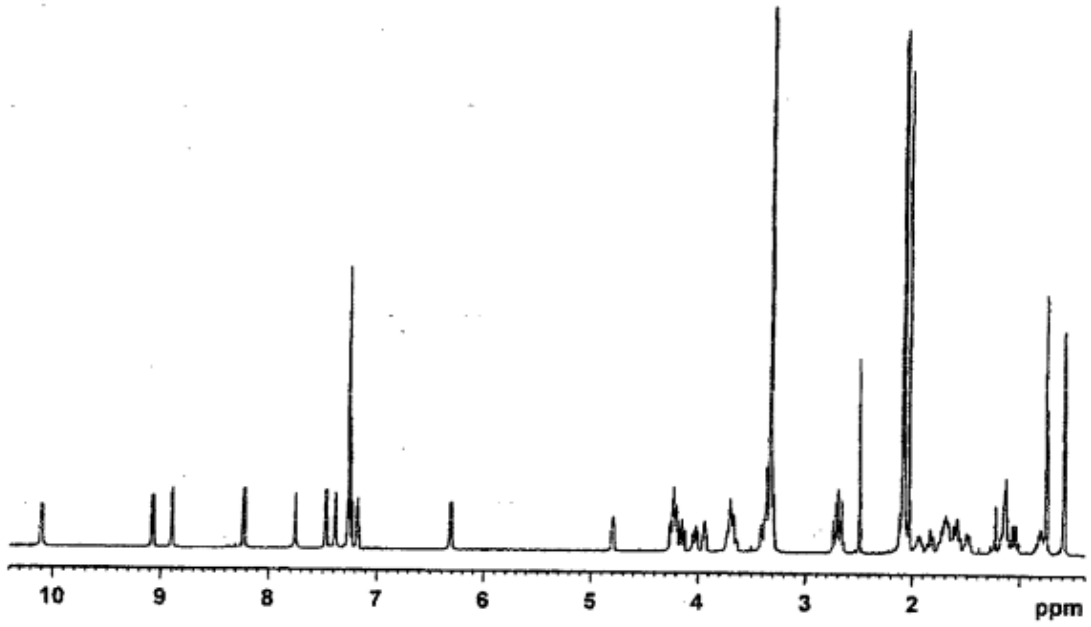


Figura 4

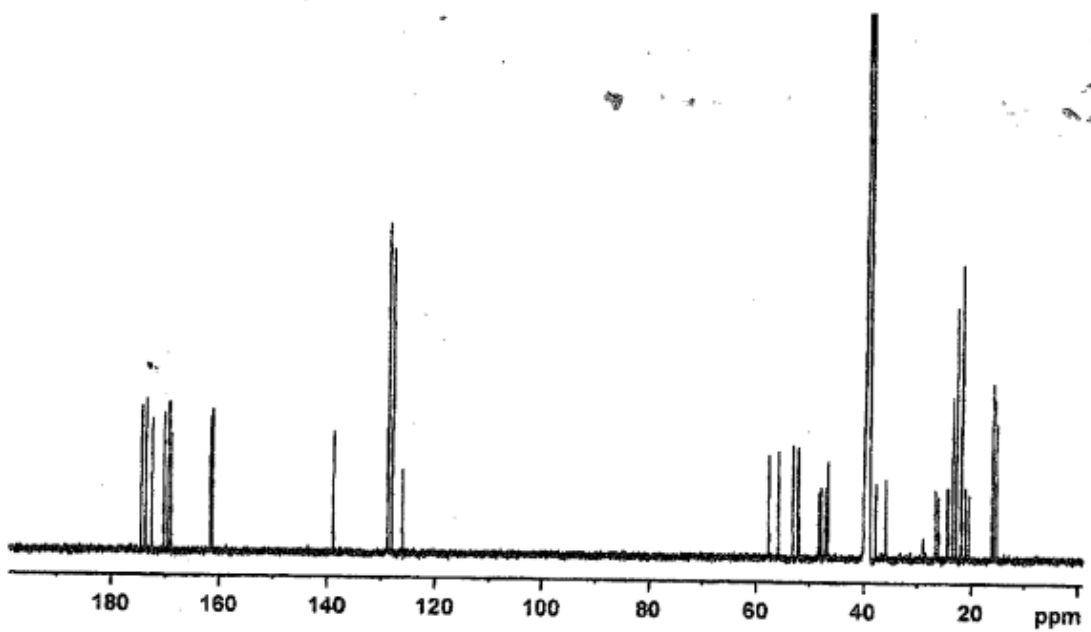


Figura 5

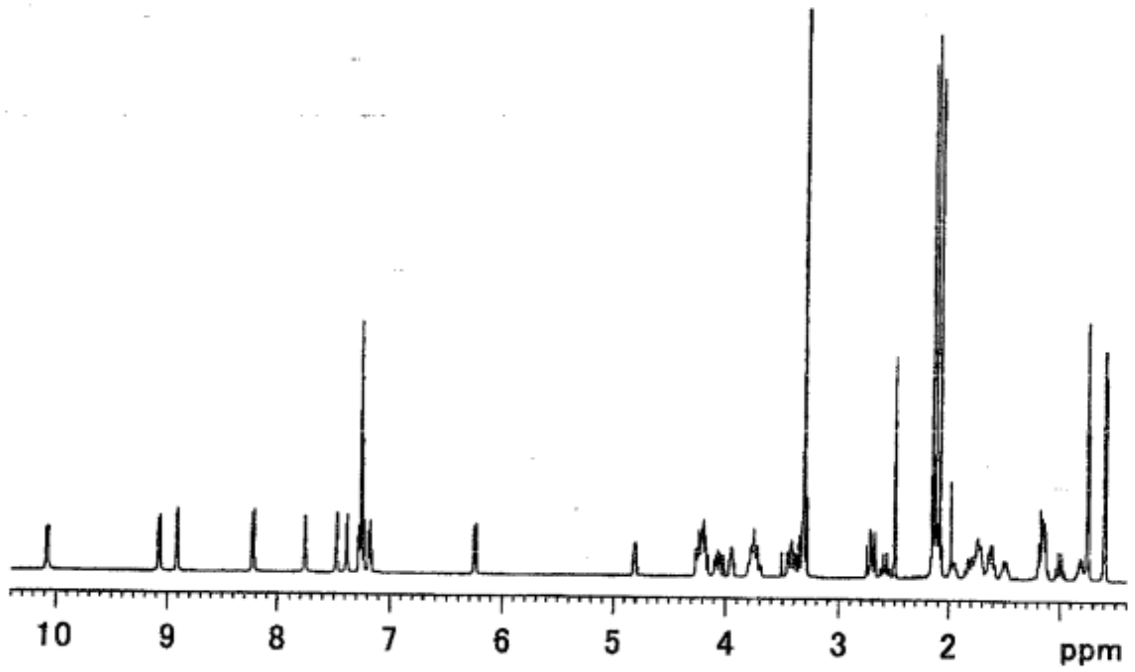


Figura 6

